

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Dragana Šegulja

ODREĐIVANJE RAZREDA I TIPA MONOKLONSKOG PROTEINA METODOM  
IMUNOSUPTRAKCIJE

Specijalistički rad

Zagreb, 2015. godina

Poslijediplomski specijalistički studij: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina

Mentor rada: Dr. sc. Danica Matišić, spec. medicinske biokemije

Specijalistički rad obranjen je dana 9. prosinca 2015. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr.sc. Slavica Dodig
2. Dr. sc. Danica Matišić
3. Prof. dr. sc. Ivana Čepelak

Rad ima 46 listova.

## **Predgovor**

Rad je izrađen u Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, pod stručnim mentorstvom voditeljice odjela dr. sc. Danice Matišić, spec. med.biokemije.

Zahvaljujem mentorici na potpori u stručnom radu te tehničarkama Marici Carić i Lidiji Volarić na pomoći pri tehničkoj izvedbi, razumijevanju i podršci tijekom izrade ovog rada.

## Sažetak

**Cilj.** Za detekciju monoklonskog proteina (MP) važno je koristiti osjetljivu metodu budući da asimptomatski bolesnici s dokazanim MP razviju multipli mijelom ili sličan mijeloproliferativan poremećaj s godišnjom stopom od 1-2%. Cilj ovog rada je usporednim analizama i interpretacijama rezultata imunofiksacije i imunosuptrakcije utvrditi prednosti i nedostatke imunosuptrakcije te procijeniti može li ova metoda u skorijoj budućnosti zamijeniti imunofiksaciju u detekciji i tipizaciji MP.

**Ispitanici i metode.** Obradeno je 50 uzoraka seruma bolesnika Zavoda za hematologiju Interne klinike KBC Zagreb. Izabrani su bolesnici kod kojih postoji sumnja na monoklonsku gamapatiju odnosno na prisutnost stanja karakteriziranog prisutnošću MP.

Elektroforeza proteina u serumu u svim je uzorcima provedena kapilarnom zonskom elektroforezom na uređaju Capillarys 2 Sebia. Koncentracija imunoglobulina A, G i M određena je turbidimetrijski na Roche Cobas 6000cee analizatoru. Imunofiksacija je provedena na Sebia Hydrasys poluautomatskom sustavu koristeći Hydragel 2/4 agarozne gelove. Imunosuptrakcija je izvođena na Capillarys 2 uređaju. Imunofiksacija se temelji na detekciji uske monoklonske vrpce na agaroznom gelu nakon elektroforeze i imunoprecipitacije dok se imunosuptrakcija temelji na usporedbi referentne slike elferograma s elferogramom nakon imunoreakcije sa specifičnim protutijelom vezanim na kuglice Sepharose.

**Rezultati.** U 44/50 uzorka jednostavno je i jednoznačno tipiziran MP objema metodama. U preostalih 6 uzoraka (biklonalna gamapatija i zadržana poliklonska sinteza neuključenih imunoglobulina) jednostavnije je bilo opisati rezultat imunofiksacije nego imunosuptrakcije što se djelomično može objasniti većim iskustvom u očitavanju rezultata imunofiksacije.

**Zaključak.** Imunosuptrakcija je dobra alternativa za imunotipizaciju monoklonskog proteina u kliničkom laboratoriju. Metoda je brza, potpuno automatizirana, ali u usporedbi s

imunofiksacijom manje osjetljivosti u detekciji MP. Stoga su iskusni i dobro educirani laboratorijski stručnjaci neophodni za interpretaciju rezultata imunosuptrakcije.

## Summary

**Objectives.** It is important to use a sensitive method to detect monoclonal protein (MP) because asymptomatic patients with MP develop multiple myeloma or similar myeloproliferative disorder at the rate of 1-2% a year. The aim of this study was with comparative analyzes and interpretations of results immunofixation electrophoresis (IFE) and immunosubtraction electrophoresis (ISE) determine the advantages and disadvantages of ISE and also assess whether this method can replace IFE in the detection and immunotyping of MP in the near future.

**Patients and Methods.** Processed are 50 serum patient samples from the Department of Hematology, Clinic for Internal Medicine, University Hospital Centre Zagreb. Patients are selected due to suspicion of monoclonal gammopathy or a condition characterized by the presence of MP. Serum protein electrophoresis was performed in all samples by capillary zone electrophoresis (CZE) method using Capillarys 2 Sebia system. Concentration of immunoglobulin G, A and M was measured on Roche Cobas 6000cee by turbidimetric procedure. IFE was performed on Sebia Hydrasys using Hydragel 2/4 IF gels. ISE was performed on Capillarys2. IFE is based on detecting appearance of monoclonal band after agarose gel electrophoresis and immunoprecipitation. The principle of ISE involves comparison of electrophoretic reference pattern with specific electrophoretic pattern obtained after immunoreaction with specific antibody bound to Sepharose beads.

**Results.** In 44/50 samples obtained results were equal and not difficult to interpret by both methods. In the remaining 6 samples (biclonal gammopathy and reserved polyclonal synthesis of uninvolved immunoglobulin) the obtained results by IFE were easier to describe than obtained by ISE which can be explained by greater experience in interpreting immunofixation results.

**Conclusion.** The ISE is a good alternative for MP immunotyping in clinical laboratory. The method is fast, fully automated, but comparing to IFE lower sensitivity in detecting MP. Therefore, experienced and well trained laboratory professionals are necessary to interpret results of ISE .

## Sadržaj

1.	Uvod i pregled područja istraživanja .....	1
1.1.	Monoklonske gamapatije .....	1
1.2.	Elektroforeza proteina u serumu kapilarnom zonskom elektroforezom .....	3
1.3.	Imunotipizacija.....	4
1.3.1.	Imunofiksacija.....	5
1.3.2.	Imunosuptrakcija.....	7
1.3.2.1.	Tumačenje nalaza imunosuptrakcije .....	10
2.	Cilj istraživanja .....	12
3.	Ispitanici i metode .....	13
3.1.	Ispitanici .....	13
3.2.	Metode.....	13
3.2.1.	Elektroforeza proteina u serumu .....	14
3.2.2.	Kvantitativno određivanje koncentracije ukupnih imunoglobulina A, G, M.....	15
3.3.3.	Imunofiksacija.....	16
3.3.4.	Imunosuptrakcija.....	19
3.3.5.	Statistička obrada rezultata.....	22
4.	Rezultati .....	23
5.	Rasprava .....	29
6.	Zaključci.....	33
7.	Literatura .....	34
8.	Popis skraćenica .....	37
9.	Životopis.....	38



# 1. Uvod i pregled područja istraživanja

## 1.1. Monoklonske gamapatije

Monoklonske gamapatije (MG) spadaju u veliku skupinu imunoproliferativnih bolesti koje karakterizira prisutnost monoklonskog proteina (MP) u serumu i/ili urinu koji stvara klon B limfocita podvrgnut genetičkoj transformaciji. Takvo stanje može biti posljedica benigne ili maligne bolesti koja se manifestira kliničkim simptomima od asimptomatskog neprogresivnog stadija do malignog agresivnog multiplog mijeloma (MM) ili drugog limfoproliferativnog poremećaja: limfoma, kronične limfocitne leukemije, Waldenstöm makroglobulinemije, amiloidoze (1).

Benigna monoklonska gamapatija, često nazvana monoklonska gamapatija neutvrđenog značenja (MGNZ), podrazumijeva koncentraciju MP manju od 30 g/L, infiltraciju koštane srži s  $\leq 10\%$  plazma stanica, normalnu sintezu neuključenih imunoglobulina, odsutnost oštećenja organa povezanih s mijelomom (koštane lezije, oštećenje funkcije bubrega). MGNZ karakterizirana je također, negativnim nalazom monoklonskih slobodnih lakih lanaca kapa ( $\kappa$ ) ili lambda ( $\lambda$ ) u serumu i/ili urinu i odsutnošću porasta koncentracije MP u narednih nekoliko godina. MGNZ se javlja s učestalošću od 1% kod ljudi starijih od 50 godina i s učestalošću od 3% kod starijih od 70 godina (2). Zbog relativno visoke pojavnosti i različitih kliničkih simptoma s kojima se bolesnici javljaju liječniku, od interesa je detektirati MP i procijeniti radi li se o MGNZ ili simptomatskoj bolesti.

Najčešća maligna bolest koju karakterizira prisutnost MP je MM. Tipični klinički simptomi u bolesnika s MM uključuju bol u kostima, anemiju, oštećenje funkcije bubrega i povećanu učestalost infekcija. Etiologija MGNZ i MM još nije u potpunosti razjašnjena, ali su prepoznati faktori rizika koji uključuju starost, muški spol, pozitivnu obiteljsku anamnezu za limfoproliferativne bolesti, negroidnu rasu i okolišne čimbenike (izloženost ionizirajućem

zračenju, herbicidima, insekticidima). Autoimune bolesti se također povezuju s povećanim rizikom za razvoj MGNZ i MM (3). Još su 1965. godine Osserman i Tahatsuki predložili teoriju kronične antigene stimulacije kao okidača za razvoj plazmocitne diskrazije (4).

Za dijagnozu multiplog mijeloma potrebna su tri ključna nalaza:

- nalaz MP u serumu i/ili urinu
- infiltracija koštane srži plazma stanicama ( $\geq 10\%$ )
- nalaz osteolitičkih žarišta kao i disfunkcija jednog ili više organa povezana s mijelomom (npr. oštećenje bubrežne funkcije, anemija, litičke ozljede).

MM je druga najčešća zloćudna novotvorina krvotvornog sustava i čini do 8% svih hematoloških zloćudnih bolesti, odnosno 1% svih zloćudnih tumora. Medijan preživljenja za MM od 1960. godine do sredine 1990-tih godina bio je 3 godine. Međutim, uvođenjem autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica u terapijski pristup bolesnika s MM, u posljednjem se desetljeću petogodišnje preživljenje procjenjuje na 30-40% (3,5,6).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, incidencija bolesti u Hrvatskoj iznosi 4,2 do 4,8 na 100 000 stanovnika godišnje. Učestalost bolesti raste s dobi, medijan dobi je 68 godina, a učestalost je nešto veća u muškaraca nego u žena (7).

Budući je MP produkt jednog klona limfocita B, predstavlja molekule imunoglobulina jednakih fizikalno-kemijskih osobina što ima za posljedicu njihovo jednako ponašanje u električnom polju i mogućnost detekcije prilikom elektroforeze proteina u serumu. Zaustavljanjem na istom mjestu u gelu ili otopini nastaje homogena uska vrpca odnosno vršak u elferogramu proporcionalan količini MP.

U zadnjim preporukama Međunarodne radne skupine za multipli mijelom (IMWG- eng. *International Myeloma Working Group*) iz 2011. navedeni su laboratorijski testovi i njihova metodologija, neophodni u svrhu postavljanja dijagnoze i procjene prognoze bolesti kod MM. Preporukama je obuhvaćena elektroforeza proteina u serumu kao test probira bolesnika

sa sumnjom na prisutnost MP u serumu, i imunofiksacija u svrhu postavljanja dijagnoze. Proteini,  $\beta$ -2 mikroglobulin i albumin, su prognostički biljezi na temelju kojih se procjenjuje prognoza bolesti prema međunarodno prihvaćenoj ljestvici ISS (eng. *International Staging System*) (2).

## **1.2. Elektroforeza proteina u serumu kapilarnom zonskom elektroforezom**

Elektroforeza je široko primjenjiv postupak koji omogućava razdvajanje i analiziranje smjese različitih električki nabijenih spojeva pri čemu brzina putovanja ovisi o veličini, obliku, koncentraciji i električnom naboju molekule, jakosti električnog polja, viskoznosti, pH, temperaturi i ionskoj jakosti pufera, osobinama nosača te o vremenu putovanja (8, 9).

Postupak razdvajanja proteina seruma u četiri frakcije pod utjecajem električnog polja prvi puta je još 1930. godine upotrijebio Tiselius. Pedesetih godina prošlog stoljeća razvojem elektroforeze na papiru metoda je postala dostupna u biomedicini. Razvoj različitih nosača (acetat celuloze, agaroze, poliakrilamida, otopine pufera) omogućio je unaprijeđenje same metode i poboljšanje njezine rezolucijske moći.

Danas je u većini kliničkih laboratorija elektroforeza na agarози zamijenjena kapilarnom zonskom elektroforezom visoke djelotvornosti (10,11).

Pomoću kapilarne zonske elektroforeze nabijene se molekule u slobodnoj otopini razdvajaju prema elektroforetskoj pokretljivosti u alkalnom puferu (pH 9,9). Većoj rezolucijskoj moći kapilarne zonske elektroforeze za razliku od dosadašnjih gel elektroforeza doprinosi tzv. elektroosmotski tok kao i tlak pri kojem se uzorak unosi u kapilare.

Elektroosmotski tok je tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Naime, unutrašnja površina stijenke kapilare sadrži brojne silanolne grupe koje se ovisno o pH vrijednosti elektrolita mogu nalaziti u anionskoj formi.

Stvara se dvostruki električni sloj, čvrsti dio (jedan red iona suprotnog naboja od onog na površini kapilare, dakle kationa) i difuzijski dio u kojem se javljaju i kationi i anioni. Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuznom dijelu dvostrukog sloja privučeni su prema katodi. Budući da su otopljeni, oni svojim kretanjem prema katodi povlače za sobom i okolnu tekućinu (12).

Po mnogim se svojstvima kapilarna elektroforeza smatra prijelazom između elektroforeze i tekućinske kromatografije.

Sustav za kapilarnu zonsku elektroforezu ima osam kapilara od posebno silanizirane vrste stakla koje rade paralelno i omogućuju osam simultanih razdvajanja. Razrijeđeni uzorak na anodnom kraju ulazi u kapilare gdje se odvija visokonaponsko razdvajanje proteina koji se direktno detektiraju pri 200 nm na katodnom kraju kapilare čime je omogućena točna relativna kvantifikacija pojedinačnih proteinskih frakcija. Kapilare se odmah ispiru otopinom za ispiranje i pripremaju za slijedeća razdvajanja. Proteini se u svakoj zoni koja sadrži jedan ili više proteina detektiraju prema slijedećem rasporedu: gama ( $\gamma$ ) globulini, beta ( $\beta$ )-2-globulini, beta ( $\beta$ )-1-globulini, alfa ( $\alpha$ )-2-globulini, alfa ( $\alpha$ )-1-globulini i albumin. Homogene zone u elferogramu, prvenstveno one u  $\beta$  i  $\gamma$  globulinskim zonama uvijek pobuđuju sumnju na prisutnost monoklonskog proteina (13).

### **1.3. Imunotipizacija**

Temelj laboratorijske dijagnostike MG predstavlja nalaz MP u serumu i/ili urinu. Kako bi klinička i laboratorijska evaluacija bolesnika s MG bila ujednačena u svim centrima koji se bave tom dijagnostikom, Američko društvo patologa i IMWG izdali su još 2000. godine smjernice za kliničku i laboratorijsku evaluaciju bolesnika s MG. U istim se smjernicama po

prvi put uvodi naziv imunotipizacije kao postupka kojim se određuje razred i tip MP, a sam postupak moguće je izvesti dvjema metodama imunofiksacijom ili imunosuptrakcijom (14).

Također se u smjernicama za upotrebu tumorskih biljega kod MG Nacionalne akademije za kliničku biokemiju (NACB- eng., *National Academy of Clinical Biochemistry*) iz 2006. godine spominje imunotipizacija.

Imunotipizaciju treba provesti u slučaju postojanja izražene homogene vrpce odnosno vrška u području od  $\alpha$ -2 do  $\gamma$  globulina u elektroforetskoj slici (elferogramu), kod postojanja kliničke sumnje na MG iako ne postoji izražen vršak u elferogramu, te kod pacijenata kod kojih se MP prvi puta izgubio kao posljedica uspješne terapije (15).

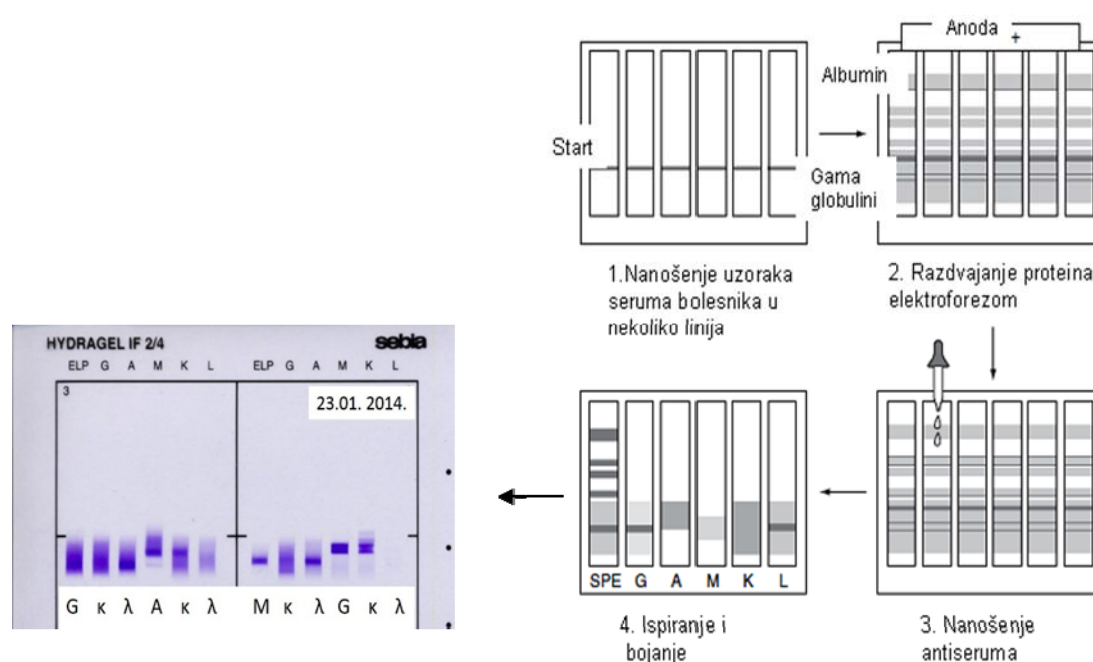
U posljednjem se desetljeću, zbog mogućnosti potpune automatizacije postupka, u kliničkim laboratorijima s velikim brojem uzoraka sve više umjesto imunofiksacije primjenjuje imunosuptrakcija.

### **1.3.1. Imunofiksacija**

Imunofiksacija je postupak koji predstavlja “zlatni standard” u definiranju razreda i tipa MP (2). Danas je to poluautomatizirani postupak koji uključuje elektroforezu proteina na agaroznom gelu, imunoprecipitaciju i vizualizaciju nespecifičnim bojenjem (slika 1-1.). Elektroforeza proteina provodi se na komercijalnim gelovima koncentracije agaroze 0,5-1,0%. Niska koncentracija otopine agaroze omogućava nastanak gela velikih pora što za posljedicu ima slobodnu migraciju proteina velike molekularne mase (10). Nakon elektroforeze proteina istog seruma u najčešće pet linija, svaka se linija na gelu inkubira specifičnim antiserumom za određeni razred teškog lanca (anti  $\gamma$ , anti  $\alpha$ , anti  $\mu$ ) i tip lakog lanca (anti  $\kappa$ , anti  $\lambda$ ). Antiserum reagira s odgovarajućom imunoglobulinskom domenom tvoreći kompleks koji ostaje fiksiran u gelu. Ostali nevezani proteini se ispiru s gela. Nakon

nespecifičnog bojenja proteina vidljiv ostaje samo fiksirani protein. MP se pojavljuje kao jače izražena vrpca na slabije obojenoj pozadini koja predstavlja zadržanu poliklonsku sintezu imunoglobulina istog razreda (10,16).

Ako postoji sumnja na prisutnost MP, a nije uočena reakcija s anti-IgA, anti-IgM i anti-IgG antiserumima preporuča se uzorak testirati anti-IgD i/ili anti-IgE antiserumima.

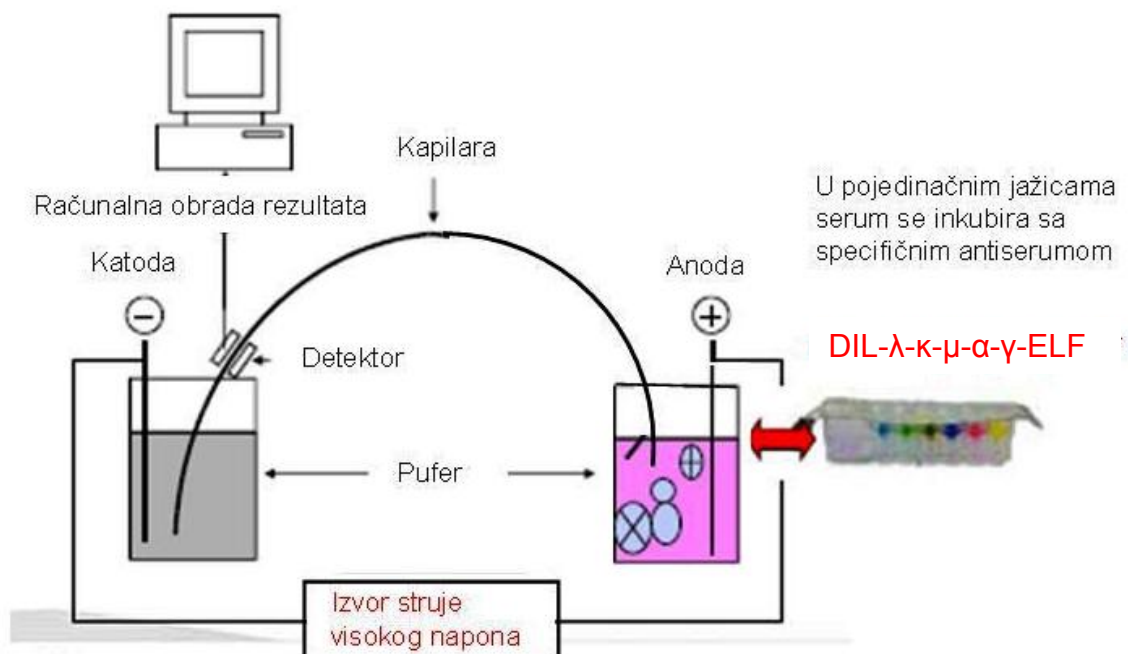


Slika 1-1. Shematski prikaz postupka imunofiksacije (preuzeto iz (15) D. Šegulja.

*Definiranje razreda i tipa monoklonskog imunoglobulina metodom imunoprecipitacije. U D. Matišić: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014, HKMB, Medicinska naklada, Zagreb, 2014:53-58)*

### 1.3.2. Imunosuptrakcija

Za razliku od imunofiksacije, imunosuptrakcija je danas potpuno automatizirani postupak koji se sastoji od imunoprecipitacije, elektroforeze proteina kapilarnom zonskom elektroforezom i spektrofotometrijske detekcije razdvojenih proteina (slika 1-2.). U jažicama segmenta na nosaču uzorka nalazi se otopina za razrijeđenje i kuglice sefaroze obložene odgovarajućim antiserumom (anti  $\gamma$ , anti  $\alpha$ , anti  $\mu$ , anti  $\kappa$ , anti  $\lambda$ ) (17,18,19). Neposredno prije elektroforeze alikvoti seruma inkubiraju se obloženim kuglicama sefaroze. Nastali kompleksi zaostaju u otopini, a u šest silaniziranih kapilara istovremeno se pod istim uvjetima provodi elektroforeza proteina. Svaka slika elektroforeze uzorka seruma inkubiranog kuglicama sefaroze obloženim odgovarajućim antiserumom tzv. antiserumska slika, uspoređuje se pomoću računalnog programa sa slikom elektroforeze nativnog uzorka seruma tj. s referentnom slikom (slika 1-3.).

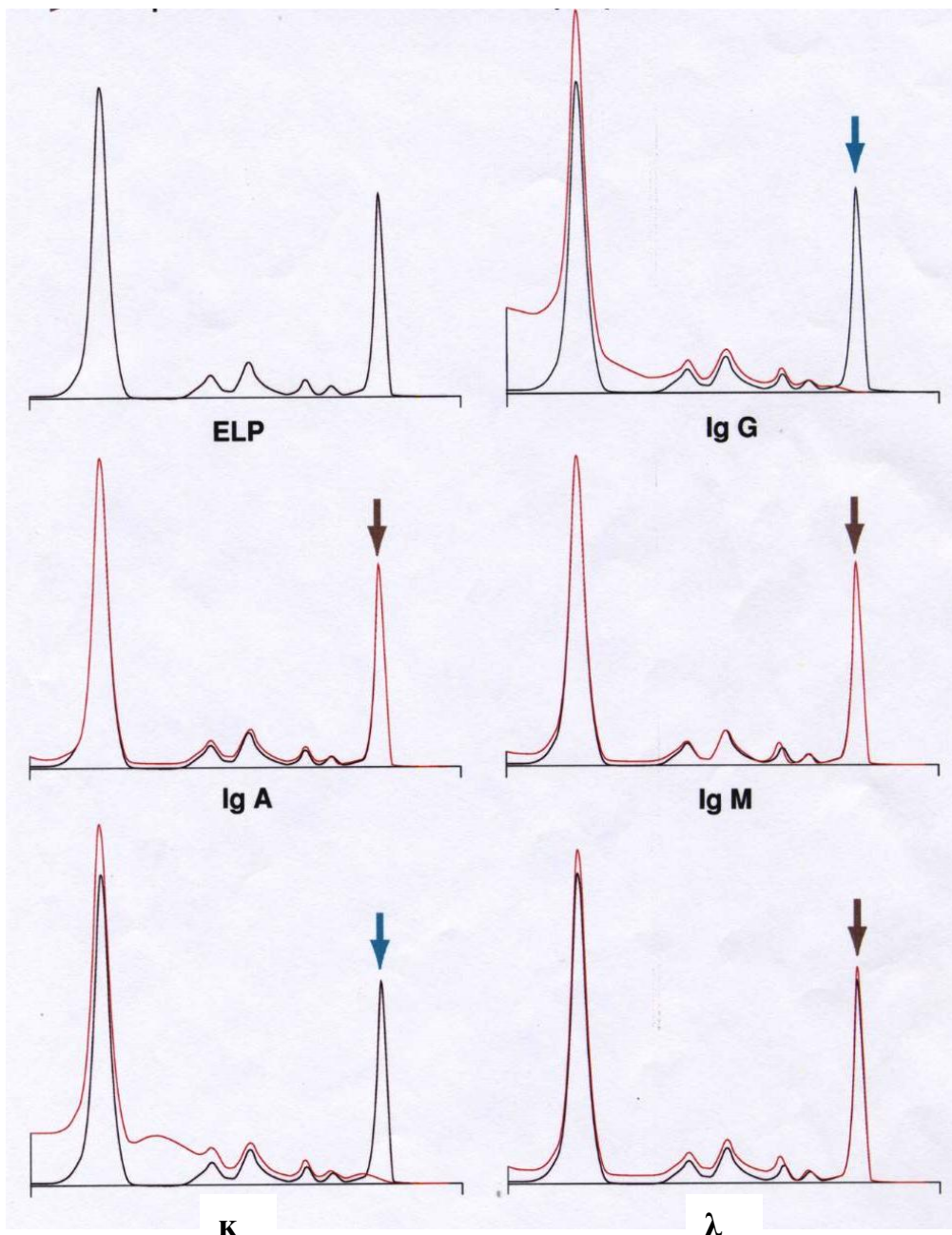


Slika 1-2. Shematski prikaz postupka imunosuptrakcije: u jažicama segmenta nalaze se otopina za razrijeđenje (DIL), antiserumi usmjereni na lake ( $\kappa$  i  $\lambda$ ) i teške ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ) lance

imunoglobulina te otopina za pripremu uzorka za elektroforezu (ELF) imunofiksacije (preuzeto iz (15) D. Šegulja. Definiranje razreda i tipa monoklonskog imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U D. Matišić: Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija-2014, HKMB, Medicinska naklada, Zagreb, 2014:53-58)

Referentna slika postiže se ubrizgavanjem uzorka pomiješanog s puferom u prvu kapilaru što osigurava cjelovitu elektroforetsku sliku proteina uzorka. Slika elektroforeze uzorka ispitivanog seruma inkubiranog odgovarajućim antiserumom postiže se ubrizgavanjem u ostale kapilare, od 2. do 6., prethodno razrijeđenog uzorka pomiješanog sa specifičnim antiserumima koji djeluju protiv  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA),  $\mu$  (IgM) teških lanaca i  $\kappa$  (slobodnih i vezanih) i  $\lambda$  (slobodnih i vezanih) lakih lanaca. Zatim se odvija visokonaponsko razdvajanje proteina koji se zahvaljujući apsorpciji UV svjetlosti peptidnih veza u proteinima mogu direktno detektirati mjereći apsorbanciju pri 200 nm na katodnom kraju kapilare. Upisivanjem slike elektroforeze uzorka ispitivanog seruma inkubiranog s odgovarajućim antiserumom preko referentne slike moguće je detektirati gamapatiju vizualizacijom gubitka monoklonske vrpce ili promjenom simetrije u antiserumskoj slici (slika 1-3.).





Slika 1-3. Elferogrami uzorka inkubiranog sa kuglicama sefaroze (crvena linija) obloženim specifičnim antiserumom koji djeluje protiv  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA),  $\mu$  (IgM) teškog lanca i  $\kappa$  (slobodnih i vezanih) i  $\lambda$  (slobodnih i vezanih) lakih lanaca uspoređeni s referentnim elferogramom (ELP) (crna linija). U prikazanom uzorku tipiziran je MP: imunoglobulin G  $\kappa$  tipa. (preuzeto iz (17) *Sebia Capillarys Immunotyping, ref. 2100, upute za korištenje, ver. 2013/10* *Sebia Capillarys Immunotyping, ref. 2100, upute za korištenje, ver. 2013/10. Sebia; 2013, str. 335-341.*)

### 1.3.2.1. Tumačenje nalaza imunoprecipitacije

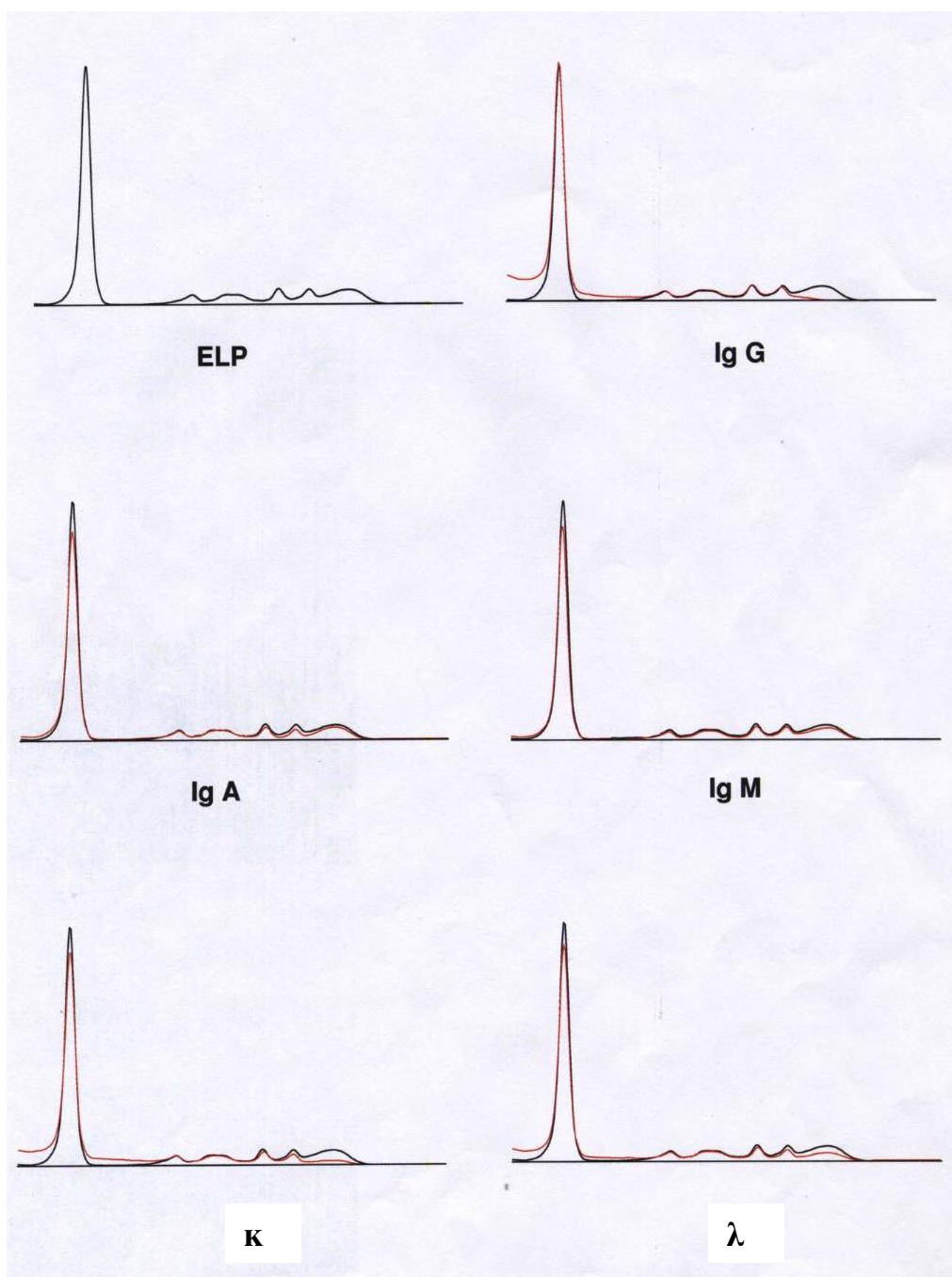
Nestanak ili promjena simetričnosti odgovarajuće frakcije u elferogramu uzorka inkubiranog s kuglicama sefaroze obloženim odgovarajućim antiserumom ukazuje na nastanak kompleksa sa specifičnim antiserumom, odnosno ukazuje na razred i tip prisutnog MP (slika 1-3.).

Treba istaknuti da će do reakcije imunoprecipitacije tj. stvaranja kompleksa doći ne samo i isključivo u prisutnosti MP, već će odgovarajući antiserum stvoriti kompleks i s odgovarajućim poliklonski sintetiziranim imunoglobulinom (slika 1-4.). Upravo zbog toga interpretacija rezultata imunoprecipitacije iziskuje educirano i iskusno stručno osoblje.

Naime, kako 80% imunoglobulina čini IgG najveći pad simetrične zvonolike krivulje imunoprecipitacije u uzorku s normalnom poliklonskom sintezom imunoglobulina dogoditi će se u području  $\gamma$  frakcije. Manji pad krivulje u području  $\beta$  frakcije odgovarati će imunoglobulinu A koji čini 15% imunoglobulina. Prisutnost IgM (5%) očitovat će se u neznatnom padu krivulje u području  $\gamma$  globulina. Budući da je fiziološki omjer  $\kappa$  i  $\lambda$  lanaca 2:1, pad krivulje u uzorku obrađenom s anti- $\kappa$  antiserumom biti će dva puta veći od onoga s anti- $\lambda$  antiserumom (20).

Na prisutnost MP treba pomisliti:

- pri uočavanju homogene frakcije u području od  $\alpha$ -2 do  $\gamma$  globulina,
- prilikom porasta  $\beta$  globulinske frakcije bez porasta  $\alpha$ -1 i  $\alpha$ -2 globulina,
- u slučaju da je frakcija  $\beta$ -2 globulina veća od frakcije  $\beta$ -1 globulina te
- u slučaju gubitka simetričnosti bilo koje frakcije u elferogramu.



Slika 1-4. Elferogrami uzorka inkubiranog kuglicama sefaroze (crvena linija) obloženim specifičnim antiserumom koji djeluje protiv  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA),  $\mu$  (IgM) teškog lanca i  $\kappa$  (slobodnih i vezanih) i  $\lambda$  (slobodnih i vezanih) lakih lanaca uspoređeni s referentnim elferogramom (ELP) (crna linija). Prikazan je rezultat imunosuptrakcije uzorka u kojem postoji uredna poliklonska sinteza imunoglobulina bez sumnje na prisutnost MP. (preuzeto iz (17) *Sebia Capillarys Immunotyping, ref. 2100, upute za korištenje, ver. 2013/10 Sebia; 2013, str. 335-341.*)

## 2. Cilj istraživanja

Monoklonski sintetizirane intaktne molekule imunoglobulina u serumu nalaze se kod MG. Iako su MG najčešći maligni poremećaji karakterizirani proliferacijom jednog ili više klonova diferenciranih B limfocita, mogu se pojaviti i u benignim stanjima i tada se govori o tzv. MGNZ.

Detektirati prisutnost MP te odrediti razred i tip monoklonski sintetiziranog proteina u što ranijoj fazi često znači doprinijeti boljoj kvaliteti života bolesnika te kasnije boljem ishodu bolesti. MGNZ progredira u limfoproliferativni poremećaj s godišnjom stopom od 1-2%.

Metoda imunofiksacije je još uvijek metoda izbora za tipiziranje MP, međutim u posljednjem se desetljeću s ciljem što većeg stupnja automatizacije i kraćeg vremena izdavanja nalaza, ubrzano razvijaju i druge metode. Trenutno jedina dostupna, potpuno automatizirana metoda koja omogućuje tipiziranje MP u rutinskoj praksi kliničkog laboratorija je imunosuptrakcija.

Cilj ovog rada je usporednim analizama i interpretacijama rezultata imunofiksacije i imunosuptrakcije utvrditi prednosti i nedostatke imunosuptrakcije te procijeniti može li ova metoda u skorijoj budućnosti zamijeniti imunofiksaciju u detekciji i tipizaciji MP.

### **3. Ispitanici i metode**

#### **3.1. Ispitanici**

U ovom istraživanju obrađeno je 50 uzoraka seruma bolesnika Zavoda za hematologiju Interne klinike KBC Zagreb. Izabrani su bolesnici kod kojih postoji sumnja na monoklonsku gamopatiju odnosno na prisutnost stanja karakteriziranog prisutnošću MP.

Populaciju obuhvaćenu ovim radom činilo je 17 (34%) žena i 33 (66%) muškaraca, prosječne dobi 67,3 godine ( $67,3 \pm 13,2$ ).

#### **3.2. Metode**

U svih 50 uzoraka učinjene su elektroforeze proteina u serumu, kvantitativno su određene koncentracije imunoglobulina A, G, i M te imunofiksacija i imunosuptrakcija sa ciljem detekcije i definiranja razreda i tipa MP.

Uspoređeni su:

- izvedba,
- rezultati i
- tumačenje rezultata imunofiksacije i imunosuptrakcije.

Laboratorijska obrada bolesnika sa sumnjom na prisutnost MP sastoji se od slijedećih stupnjeva:

- elektroforeze proteina u serumu,
- kvantitativnog određivanja koncentracije ukupnih imunoglobulina A, G i M te
- imunofiksacije seruma.

Proteini seruma su u električnom polju razdvojeni kapilarnom zonskom elektroforezom, a ukupne koncentracije imunoglobulina A, G, M određene su imunoturbidimetrijskom metodom na imunokemijskom analizatoru Cobas 6000cee, Roche Diagnostics. Tipiziranje

MP učinjeno je paralelno metodom imunofiksacije i imunosuptrakcije sa ciljem uspoređivanja nove metode imunosuptrakcije uobičajenom rutinskom laboratorijskom metodom imunofiksacije. Imunofiksacija seruma izvedena je na agaroznom gelu koristeći uređaj Hydrasys, reagense i antiserume tvrtke Sebia. Za imunosuptrakciju, potpuno automatiziranu metodu koja koristi princip kapilarne zonske elektroforeze, korišten je uređaj Capillarys 2 i odgovarajući potrošni materijal tvrtke Sebia.

### **3.2.1. Elektroforeza proteina u serumu**

Elektroforeza proteina u serumu izvođena je prema laboratorijskom postupku LP-5.5-062-1 Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb akreditiranom prema normi HRN ISO EN 15189:2012.

- Uzorak: serum, alikvot označen crtičnim kodom
- Metoda: kapilarna zonska elektroforeza s direktnom detekcijom razdvojenih proteina pri 200 nm. Zonska elektroforeza omogućava razdvajanje nabijenih čestica u otopini elektrolita pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda (11,13).
- Reagens:
  - Capillarys protein(e) 6, Sebia reagens, ref 2003
- Potreban pribor:
  - Capillarys otopina za ispiranje, ref 4541
  - Segmenti za razrijeđivanje
  - Filteri
  - Destilirana voda
  - Nosači za uzorke
  - Komercijalni kontrolni uzorci: Normal Control i Hipergamma Control

- Otopine za održavanje uređaja Capillarys2
- Uređaj Sebia Capillarys 2 – višeparametrijski uređaj za razdvajanje proteina seruma u osam paralelnih kapilara. Uzorci se usisavaju na anodnom kraju kapilara u kojima se odvija razdvajanje proteina kapilarnom zonskom elektroforezom. Uvjeti u kojima se odvija elektroforeza definirani su postavkama u uređaju pod programom PROTEIN(E) 6 (20 mBar, 35,5 °C, 7800 V, 228 s). Razdvojeni proteini detektiraju se direktno na katodnom kraju kapilare pri 200 nm (13).

### **3.2.2. Kvantitativno određivanje koncentracije ukupnih imunoglobulina A, G, M**

Koncentracije ukupnih imunoglobulina A, G i M određene su prema laboratorijskim postupcima LP-5.5-061-(1-3) Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb akreditiranom prema normi HRN ISO EN 15189:2012.

- Uzorak: serum, alikvot označen crtičnim kodom
- Metoda: imunoturbidimetrija. Metoda se temelji na specifičnoj imunokemijskoj reakciji između protutijela i antigena u uzorku pri čemu nastaju imunokompleksi koji uzrokuju povećanje turbiditeta otopine. Smanjenje intenziteta ulazne zrake mjeri se pri 340 nm i proporcionalno je koncentraciji antigena u uzorku (21).
- Reagensi:
  - Tinaquant IgA (kozja anti-humana IgA protutijela, TRIS pufer 20 mmol/L, pH 8.0, NaCl 200 mmol/L, polietilenglikol 3,6%) (21)
  - Tinaquant IgG (kozja anti-humana IgG protutijela, TRIS pufer 20 mmol/L, pH 8.0, NaCl 200 mmol/L, polietilenglikol 3,6%) (21)

- Tinaquant IgM (kozja anti-humana IgM protutijela, TRIS pufer 20 mmol/L, pH 8.0, NaCl 200 mmol/L, polietilenglikol 3,6%) (21)
- Potreban pribor:
  - Kalibrator C.f.a.s. Protein
  - Komercijalni kontrolni uzorci: PreciControl ClinChem razina 1 i 2
  - Nosači za uzorke
  - Otopine za održavanje analizatora Cobas 6000cee
- Uređaj Roche Cobas 6000cee – imunokemijski analizator koji se sastoji od tri integrirana modula s mogućnošću izvedbe testova metodama imunoturbidimetrije i elektrokemiluminiscencije (ECLIA).

### 3.3.3. Imunofiksacija

Imunofiksacija je izvođena prema laboratorijskom postupku LP-5.5-062-6 Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb akreditiranom prema normi HRN ISO EN 15189:2012.

- Uzorak: serum je potrebno razrijediti otopinom (pH 7,5±0,5, bromfenolplavilo) iz kompleta regensa prema razrijeđenjima preporučenim od proizvođača (Tablica 3-1).

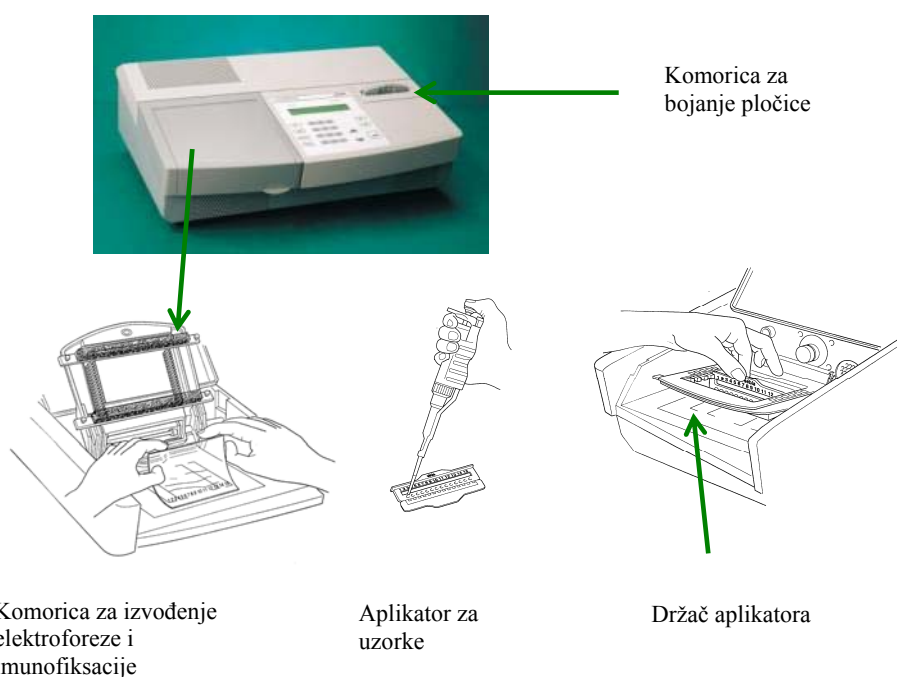
Tablica 3-1. Preporučena razrijeđenja za pripremu uzorka za imunofiksaciju

	SERUM (uL)	DILUENT (uL)
IgG ( $\gamma$ )	10	50
IgA ( $\alpha$ ), IgM ( $\mu$ ), $\kappa$ , $\lambda$	15	30



- Metoda: imunofiksacija. Sastoji od nekoliko stupnjeva:
  - Elektroforeze proteina seruma u alkalnom agaroznom gelu
  - Imunoprecipitacije razdvojenih imunoglobulina sa specifičnim antiserumom
  - Ispiranja nevezanih protutijela
  - Bojanja precipitata i uklanjanja viška boje
  - Tumačenja rezultata (11, 16)
- Reagens: komplet reagensa pod nazivom Hydragel IF2/4 tvrtke Sebia, ref 4301 (16):
  - AGAROZNI GEL (pH 9,2±0,5) - spreman za upotrebu
  - PUFERIRANE SPUŽVICE (9,1±0,5) - spremne za upotrebu.  
Osiguravaju kontakt između gela i elektroda.
  - BOJA ACID VIOLET (pH 2,0)- matičnu otopinu razrijediti do 300 mL s destiliranom vodom.
  - DILUENT - za razrjeđivanje uzoraka. Spreman za upotrebu.
  - ANTISERUMI (imunoglobulini sisavca) - spremni za upotrebu.  
Razlikuju se po bojama spremnika: anti  $\gamma$ , anti  $\alpha$ , anti  $\mu$ , anti  $\kappa$ , anti  $\lambda$
- Potreban pribor:
  - APLIKATORI I SEGMENTI ZA NANOŠENJE ANTISERUMA
  - FILTER PAPIR-TANKI (1 mm)- za uklanjanje viška pufera prije nanošenja uzorka.
  - FILTER PAPIR-DEBELI (3 mm)- za uklanjanje viška neprecipitiranih proteina nakon imunofiksacije.
  - OTOPINA ZA ODBOJAVANJE (engl. *destaining solution*) priprema se nadopunjavanjem 5 mL matične otopine do 5 L s destiliranom vodom.

- OTOPINA ZA ISPIRANJE (engl. *wash solution*) priprema se nadopunjavanjem do 5 L destiliranom vodom
- FLUIDIL - otopina soli za obradu viskoznih i zamućenih seruma.
- Fiziološka otopina (0,9% NaCl)
- Komercijalni kontrolni uzorak : IT/IF Control
- Uređaj Sebia Hydrasys - poluautomatski sustav za izvođenje elektroforeze na agaroznom gelu. Uređaj se sastoji od dva modula: elektroforetskog modula i modula za vizualizaciju. U elektroforetskom modulu nalazi se Peltierovim elementom temperirana ploča na koju se nanosi agarozni gel i u alkalnom pH razdvajaju proteini seruma. U istom se modulu ručno na agarozni gel s razdvojenim proteinima nanose specifični antiserumi i odvija imunoprecipitacija. Bojanje, otklanjanje boje i sušenje gela odvija se u modulu za vizualizaciju tj. u komorici za bojanje (slika 3-1.). Uvjeti u kojima se odvija imunofiksacija definirani su postavkama u uređaju pod programom 8, 2/4 IF (pH=9,2±0,5, pod konstantom od 20 W do akumulacije 42 Vh (otprilike 9 min) pri 20 °C) (16).

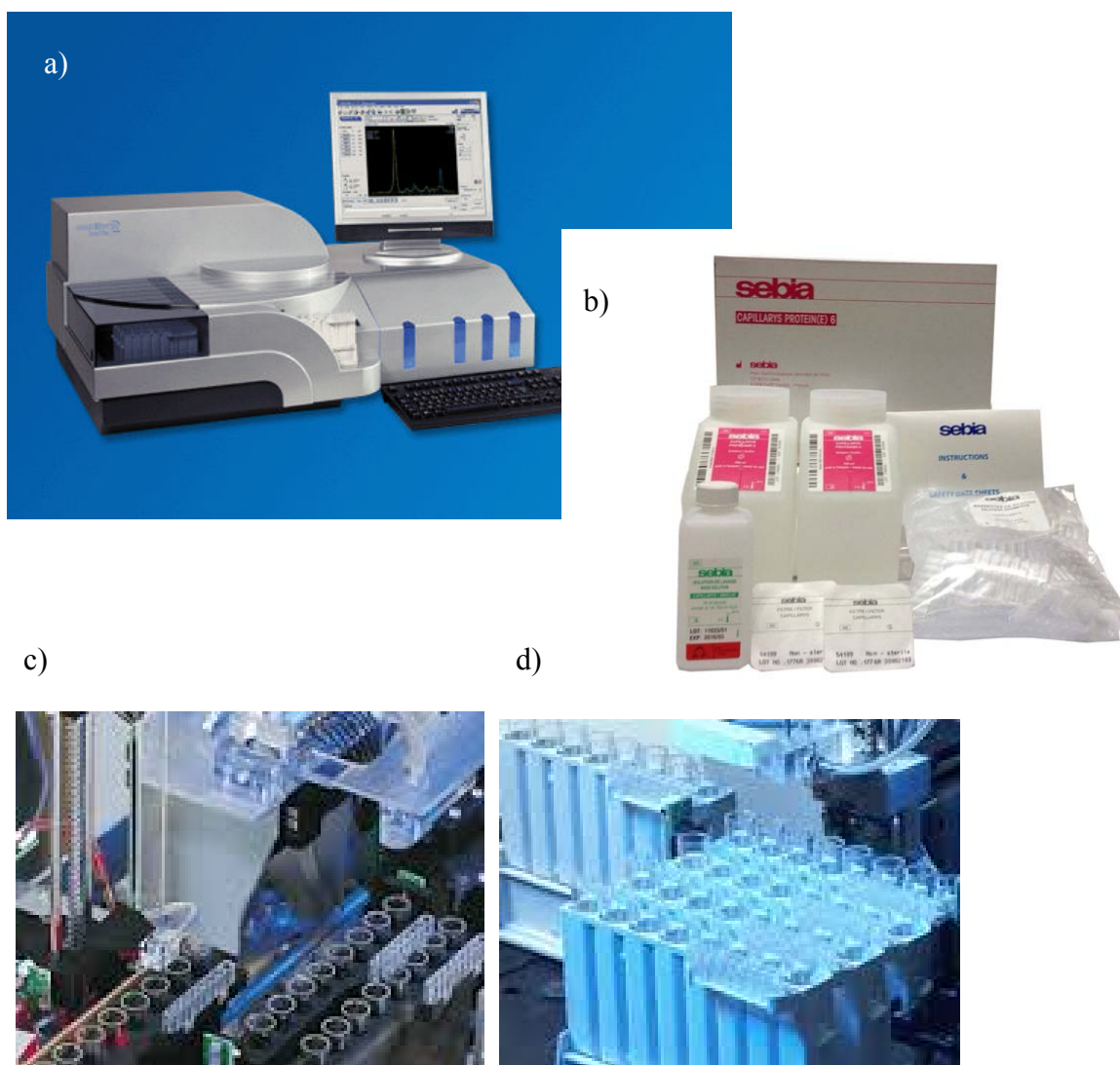


Slika 3-1. Prikaz dijelova uređaja za poluautomatsku elektroforezu na agaroznom gelu, Sebia Hydrasys: komorica za elektroforezu i imunofiksaciju te komorica za vizualizaciju gela (preuzeto iz (22) D. Matišić. *Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija*. U: A. Stavljenić Rukavina, M. Mesarić, ur. *Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima*, Medicinska naklada, 2013:45-53

### 3.3.4. Imunosuptrakcija

- Uzorak: serum, alikvot označen crtičnim kodom
- Metoda: imunosuptrakcija. Sastoji se od nekoliko stupnjeva:
  - Pripreme razrijeđenog uzorka seruma i uzorka seruma nakon inkubacije sa specifičnim antiserumima
  - Usisavanja pripremljenih uzoraka u šest kapilara, razdvajanja proteina kapilarnom zonskom elektroforezom, direktne detekcije razdvojenih proteina
  - Tumačenja rezultata - uspoređivanjem referentne slike elektroforeze sa slikama elektroforeze uzoraka obrađenih antiserumom (11,17)
- Reagens:
  - Capillarys protein(e) 6, Sebia reagens, ref 2003
  - Capillarys immunotyping kit, segmenti sa specifičnim antiserumima (imunoglobulini sisavaca anti-humani  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), ref 2100
- Potreban pribor:
  - Capillarys otopina za ispiranje
  - Komercijalni kontrolni uzorak: IT/IF Control
  - Destilirana voda
  - Nosači za uzorke

- Otopine za održavanje uređaja Capillarys2
- Uređaj Sebia Capillarys 2 – višeparametrijski uređaj za razdvajanje proteina seruma u šest paralelnih kapilara. Uzorci se usisavaju na anodnom kraju kapilara u kojima se odvija razdvajanje proteina kapilarnom zonskom elektroforezom. Razdvojeni proteini detektiraju se direktno na katodnom kraju kapilare pri 200 nm. Uvjeti u kojima se odvija imunoprecipitacija definirani su postavkama u uređaju pod programom IMMUNOTYPING 6 (20 mBar, 35,5 °C, 7800 V, 228 s) (17,20).



Slika 3-2. Prikaz sustava za kapilarnu zonsku elektroforezu i imunosuptrakciju:

- a) uređaj Capillarys 2 za kapilarnu zonsku elektroforezu
- b) potrošni materijal za kapilarnu zonsku elektroforezu i imunosuptrakciju
- c) dio sustava za pipetiranje uzoraka u kapilare, dio uređaja Capillarys 2
- d) nosači uzoraka s uzorcima i segmentima za razrijeđenje uzoraka

### **3.3.5. Statistička obrada rezultata**

Rezultati su statistički obrađeni koristeći program MS Excel 2007 korisnika KBC Zagreb.

Medijan (M) i interkvartilni raspon (IQR) korišteni su u prikazivanju koncentracije imunoglobulina G, A i M u serumu.

## 4. Rezultati

Ovim radom obuhvaćeno je 50 uzoraka seruma bolesnika Zavoda za hematologiju Interne klinike KBC Zagreb. Nakon učinjene elektroforeze proteina u serumu, kvantitativno određenih koncentracija imunoglobulina A, G, i M te imunofiksacije i imunosuptrakcije uspoređeni su: izvedba, rezultati i tumačenje rezultata imunofiksacije i imunosuptrakcije.

Kao moguća mjera koncentracije MP osim koncentracija imunoglobulina A, G, i M u tablici 4-1. prikazane su i koncentracije  $\beta$  i  $\gamma$  globulina. Najmanja vrijednost  $\beta$  globulinske frakcije zabilježena je u uzorku broj 8 (4,10 g/L), a najveća u uzorku broj 45 (53,20 g/L). Medijan vrijednosti  $\beta$  globulinske frakcije je 7,45 g/L [M(IQR) = 7,45 (6,53-13,88)]. Najmanja vrijednost  $\gamma$  globulinske frakcije zabilježena je u uzorku broj 2 (1,19 g/L), a najveća u uzorku broj 20 (106,60 g/L). Medijan vrijednosti  $\gamma$  globulinske frakcije je 15,40 g/L [M(IQR) = 15,40 (8,53-23,85)].

Koncentracije IgG bile su u svim uzorcima u rasponu od 0,11 do 103,00 g/L s medijanom 13,73 g/L [M(IQR) = 13,73 (8,34-22,33)]. Određene su koncentracije IgA u rasponu od 0,10 do 46,63 g/L s medijanom 1,09 g/L [M(IQR) = 1,09 (0,39-2,42)], dok su koncentracije IgM bile u rasponu od 0,07 do 20,71 g/L s medijanom 0,39 g/L [M(IQR) = 0,39 (0,21-1,57)].

Među 50 analiziranih uzoraka nađeni su svi najčešći razredi i tipovi MP (G, A, M,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) kao i biklonalne vrpce imunoglobulina (uzorci 2, 11, 27) te slobodni laki lanci imunoglobulina (uzorak 29).

Tablica 4-1. Koncentracije IgA, IgG, IgM,  $\beta$  i  $\gamma$  globulina, te interpretacija rezultata metodama imunofiksacije i imunosuptrakcije

R.br.	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	$\beta$ globulini (g/L)	$\gamma$ globulini (g/L)	IMUNOFIKSACIJA	IMUNOSUPTRAKCIJA
1	15.84	0.35	2.50	25.60	1.60	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
2	4.92	0.74	12.84	18.70	1.19	MP IgM $\kappa$ TIPA + MP IgM $\lambda$ TIPA	MP IgM $\kappa$ TIPA + MP IgM $\lambda$ TIPA
3	19.35	1.01	2.31	7.40	22.20	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
4	8.74	0.91	20.71	6.50	23.70	MP IgM $\kappa$ TIPA	MP IgM $\kappa$ TIPA
5	68.50	0.12	0.18	5.10	72.30	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
6	3.64	13.21	0.08	15.20	4.10	MP IgA $\kappa$ TIPA	MP IgA $\kappa$ TIPA
7	4.42	13.77	0.12	21.60	1.20	MP IgA $\lambda$ TIPA	MP IgA $\lambda$ TIPA
8	23.15	0.32	0.35	4.10	21.10	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
9	44.06	0.20	0.37	6.50	39.60	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
10	0.11	46.63	0.16	5.20	37.00	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
11	0.18	10.80	0.14	5.90	13.00	MP IgG $\lambda$ TIPA + MP SLOBODNI LAKI LANCI Ig $\lambda$ TIPA*	—
12	14.38	0.12	0.24	6.80	15.20	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
13	9.78	1.84	8.35	19.90	15.10	UZ POLIKONSKU SINTEZU Ig NADEN MP IgM $\lambda$ TIPA *	—
14	32.72	0.37	0.41	7.40	26.10	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
15	42.07	0.37	0.41	6.80	41.70	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
16	1.92	42.59	0.05	49.70	2.30	MP IgA $\kappa$ TIPA	MP IgA $\kappa$ TIPA
17	20.37	0.40	0.29	24.20	2.10	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
18	9.95	0.44	0.25	19.40	14.70	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
19	9.73	2.56	1.46	19.80	12.10	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
20	103.00	0.25	0.21	6.20	106.60	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
21	11.04	11.29	0.16	12.00	9.80	MP IgG $\kappa$ TIPA I IZRAŽEN POLIKLONSKI PORAST IgA *	—
22	20.21	1.05	1.66	6.10	27.20	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
23	10.54	1.59	11.06	7.10	16.00	MP IgM $\kappa$ TIPA	MP IgM $\kappa$ TIPA
24	12.73	0.40	1.57	5.90	13.40	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
25	9.86	1.99	15.44	7.50	19.00	MP IgM $\lambda$ TIPA	MP IgM $\lambda$ TIPA
26	13.43	2.65	1.05	8.40	13.70	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
27	10.29	1.21	0.72	7.80	12.80	2 MONOKLONSKKE VRPCE IgG $\kappa$ TIPA*	—
28	8.21	1.16	1.84	13.20	8.60	SLABO IZRAŽEN MP IgG $\kappa$ TIPA*	—
29	4.16	0.48	0.12	10.00	4.70	MP SLOBODNI LAKI LANCI Ig $\lambda$ TIPA	MP SLOBODNI LAKI LANCI Ig $\lambda$ TIPA
30	42.89	0.41	0.29	4.40	41.60	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
31	18.44	1.66	0.67	7.40	17.80	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
32	60.44	0.39	0.30	5.90	61.90	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
33	3.09	22.88	0.19	26.20	3.60	MP IgA $\kappa$ TIPA	MP IgA $\kappa$ TIPA
34	10.32	0.40	1.57	7.40	12.10	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
35	16.13	1.81	0.39	7.10	16.40	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
36	15.54	0.92	0.33	6.30	16.50	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
37	13.00	0.10	0.09	7.10	14.00	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
38	14.02	1.35	2.07	8.70	15.60	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
39	17.29	1.84	2.00	7.60	19.50	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
40	79.93	0.25	0.08	13.00	60.40	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
41	5.44	1.22	4.71	6.60	8.50	SLABO IZRAŽEN MP IgM $\lambda$ TIPA*	—
42	34.05	0.20	0.27	4.90	31.60	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
43	16.38	1.12	0.79	6.60	15.90	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
44	5.78	7.07	0.18	14.10	5.10	MP IgA $\kappa$ TIPA	MP IgA $\kappa$ TIPA
45	54.46	0.16	0.30	53.20	1.60	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
46	29.15	1.02	0.26	7.10	19.60	MP IgG $\kappa$ TIPA	MP IgG $\kappa$ TIPA
47	22.42	1.18	0.50	7.70	23.90	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA
48	5.33	6.36	0.64	12.40	6.36	MP IgA $\kappa$ TIPA	MP IgA $\kappa$ TIPA
49	2.15	16.37	0.07	25.90	2.40	MP IgA $\kappa$ TIPA	MP IgA $\kappa$ TIPA
50	22.06	4.65	0.63	8.50	24.00	MP IgG $\lambda$ TIPA	MP IgG $\lambda$ TIPA



Najzastupljeniji detektirani MP s obje metode bio je IgG razreda, N=23 (46%)  $\kappa$  tipa i N=10 (20%)  $\lambda$  tipa. Drugi najčešće detektirani MP je IgA razreda, u 7 uzoraka (14%), dok je u svega 3 uzorka (6%) detektiran MP IgM razreda (tablica 4-1.). Kod ukupno 7 uzoraka (14%) nađen je slabo izražen MP (N=2, 4%), zadržana poliklonska sinteza imunoglobulina (N=2, 4%), monoklonski slobodni laki lanci (N=2, 4%) te biklonaalna sinteza imunoglobulin (N=1, 2%).

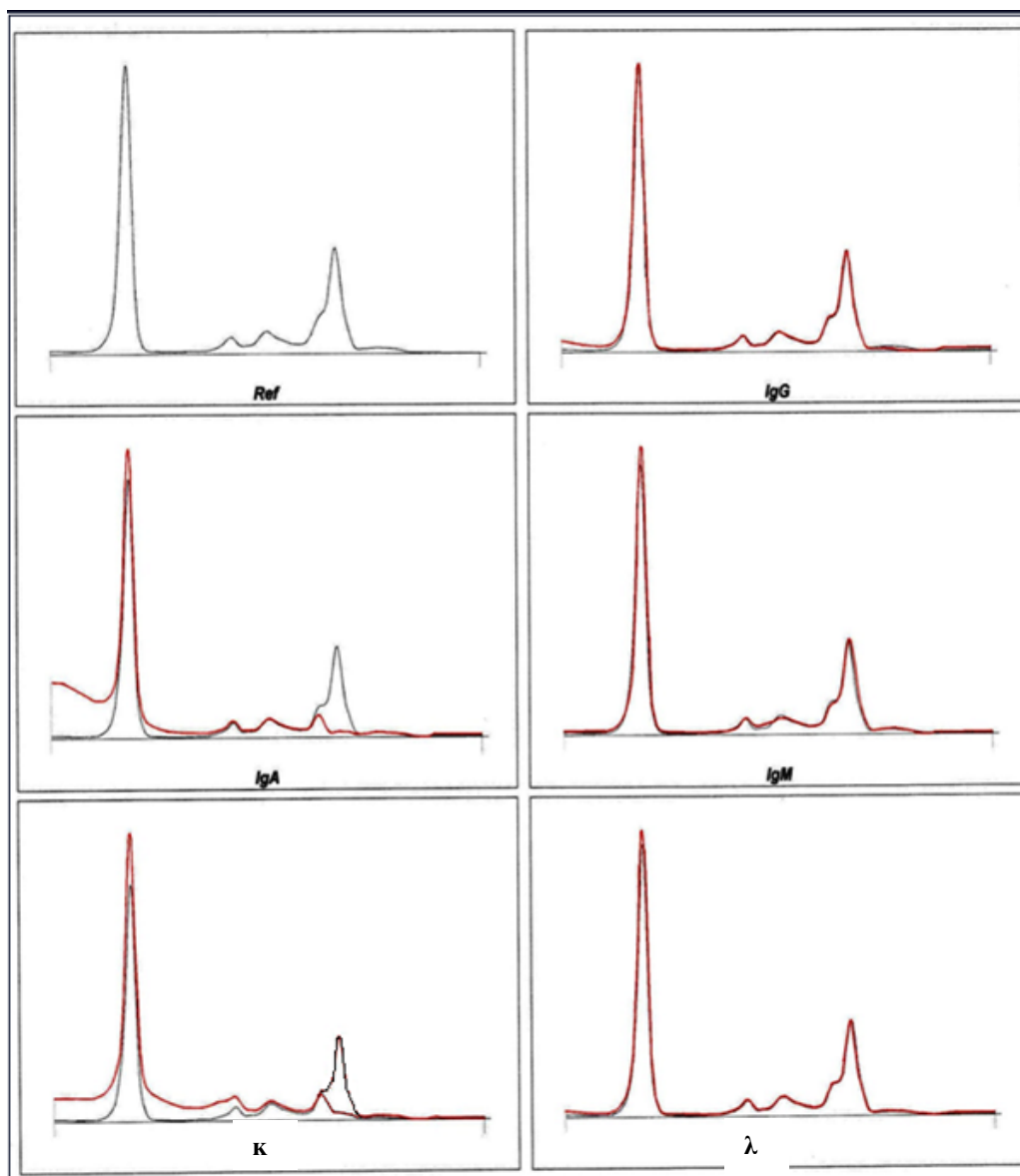
U 6 uzoraka (12%) označenih (\*) u Tablici 4-1. nije bilo moguće jednoznačno i sa sigurnošću opisati rezultat imunosuptrakcije bez rezultata imunofiksacije.

Tablica 4-2. Prikaz strukture detektiranih MP, razrada po razredu i tipu MP

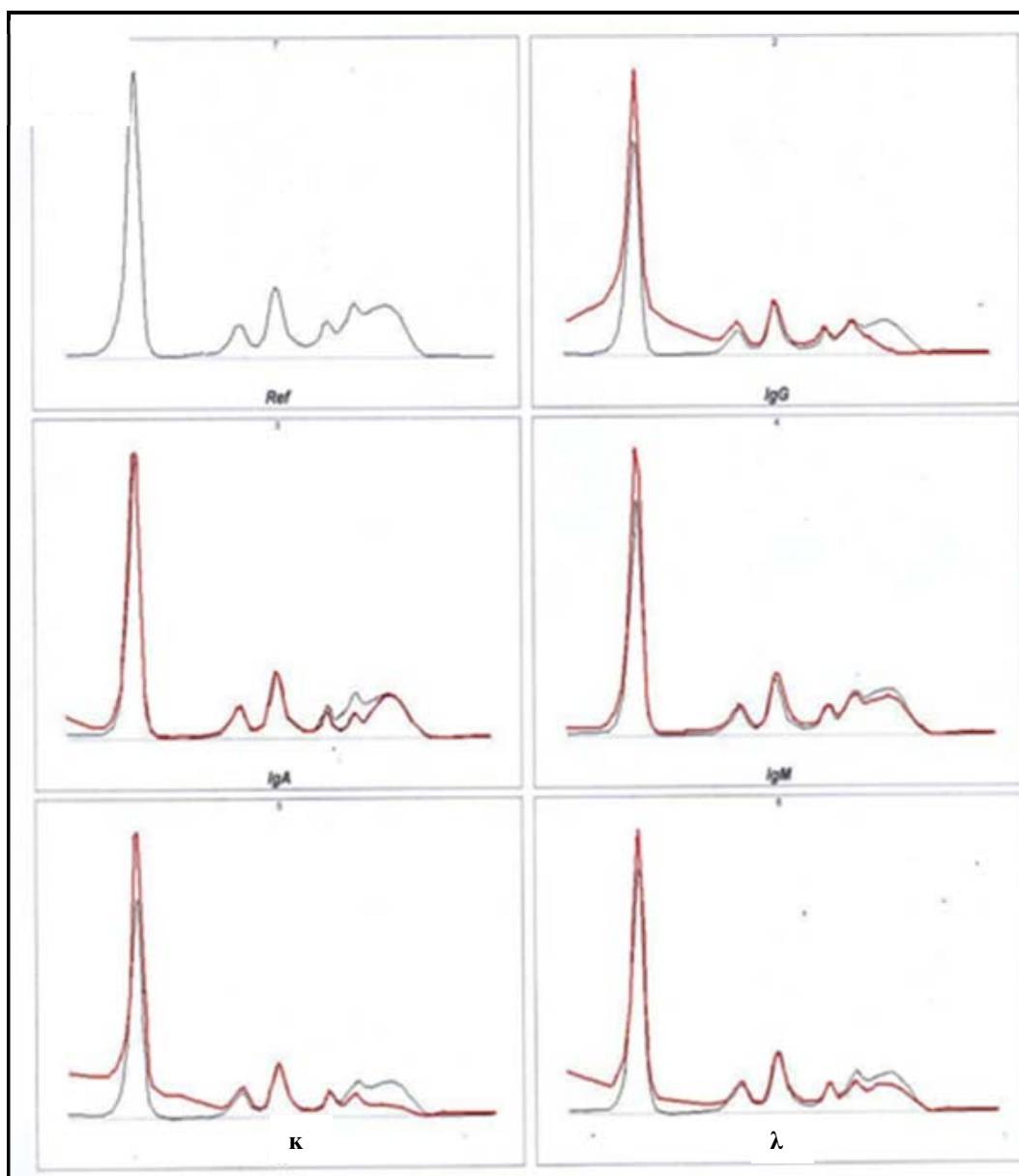
DETEKTIRANI MP	N	%
<b>MP IgG <math>\kappa</math> TIPA</b>	23	46
<b>MP IgG <math>\lambda</math> TIPA</b>	10	20
<b>MP IgA <math>\kappa</math> TIPA</b>	6	12
<b>MP IgA <math>\lambda</math> TIPA</b>	1	2
<b>MP IgM <math>\kappa</math> TIPA</b>	2	4
<b>MP IgM <math>\lambda</math> TIPA</b>	1	2
<b>MP SLOBODNI LAKI LANCI Ig</b>	1	2
<b>SLABO IZRAŽEN MP, BIKLONALNA GAMAPATIJA</b>	6	12

Imunofiksacija je poluautomatizirani postupak, što znači da je pojedine faze u postupku bilo potrebno odraditi ručno nakon zvučnog signala koji upozorava o dovršetku prethodne faze (npr. nanijeti agarozni gel u komoricu za elektroforezu, odpipetirati uzorke u jažice gela, nanijeti filter papir za uklanjanje viška antiseruma, prenijeti gel u komoricu za ispiranje,

bojanje i sušenje) (slika 3-1). Na jednom agaroznom gelu moguće je imunotipizirati četiri uzorka, a cijeli postupak traje 1h i 30 min. Nasuprot imunofiksacije, imunoprecipitacija je potpuno automatizirani postupak, od ulaska uzorka u uređaj Capillarys 2 na nosaču uzoraka do rezultata bilo je potrebno svega 10 minuta (slika 4-1 i 4-2).



Slika 4-1. Rezultat imunoprecipitacije. Preklapanjem referentnog elferograma (crna linija) nativnog uzorka i elferograma uzorka nakon inkubacije sa specifičnim antiserumima (crvena linija) nađen je monoklonski imunoglobulin A  $\kappa$  tipa. Pregledom referentnog elferograma uočava se izražen vršak u području  $\beta$  frakcije. Nakon reakcije s antiserumima na  $\alpha$  teški lanac i  $\kappa$  laki lanac došlo je na istom mjestu do potpunog pada krivulje.



Slika 4-2. Rezultat imunoprecipitacije. Preklapanjem referentnog elektroferograma (crna linija) nativnog uzorka i elektroferograma uzorka nakon inkubacije sa specifičnim antiserumima (crvena linija) nije uočena promjena u simetriji vrhova suspektih na prisutnost monoklonskog proteina. Rezultat imunoprecipitacije upućuje na poliklonsku hipergamaglobulinemiju. Pregledom referentnog elektroferograma uočava se povećana  $\beta$ -2 frakcija te područje između  $\beta$  i  $\gamma$  frakcije. Nakon reakcije s antiserumima došlo je do simetričnog pada krivulje na svim elektroferogramima. Pad krivulje s anti- $\kappa$  antiserumom duplo je veći od pada krivulje s anti- $\lambda$  antiserumom što odgovara fiziološkom omjeru  $\kappa/\lambda$  lanaca.

## 5. Rasprava

U ispitivanoj skupini detektirani su svi najčešći razredi i tipovi MP. U najvećem broju uzoraka (46%) detektiran je MP IgG  $\kappa$  tipa, a u najmanjem IgM  $\lambda$  tipa (2%). Distribucija MG po razredu i tipu MP u ovom radu razlikuje se od one opisane u rezultatima studije provedene od 1985.-1990. godine u Nantes Regional Hospital u Nantesu (Francuska) u koju je bilo uključeno 2200 uzoraka monoklonskih gamopatija. U navedenoj studiji najčešće je detektiran MP IgG razreda (46,9%), zatim slijede MP IgM razreda (38%), MP IgA razreda (9%), MP slobodnih lakih lanaca  $\kappa$  i  $\lambda$  (3%), biklonalne gamopatije (3%), MP IgD (0,1%) (10). Razlika u distribuciji detektiranog MP može se objasniti varijacijama ovisnim o geografskom području i obuhvaćenoj populaciji.

Imunoglobulin A najčešće nalazimo u  $\beta$  globulinskoj frakciji, a imunoglobulin M u  $\gamma$  globulinskoj frakciji. Imunoglobulin G se može zaustaviti na čitavom području od  $\alpha$ -2 do  $\gamma$  globulina (10,11). Vrlo često MP IgG razreda nalazimo u području  $\gamma$  globulina, no to nije i ne može biti pravilo. To se može vidjeti na primjerima uzoraka broj 1, 17 i 45 gdje se detektirani MP IgG razreda zaustavio u  $\beta$  globulinskoj frakciji. Zbog činjenice da MP možemo naći u nekoliko frakcija uklopljen zajedno s ostalim serumskim proteinima lako može doći do preklapanja i previda prisutnosti monoklonske komponente prisutne u niskim koncentracijama prilikom imunosuptrakcije (20). Sve navedeno pokazuje da sam položaj vrška u elferogramu ne može biti kriterij za definiranje MP te da svaka pojava homogene vrpce u području od  $\alpha$ -2 do  $\gamma$  globulina, uz isključenje prisutnosti fibrinogena i kompleksa hemoglobin-hemopeksin, treba laboratorijskog stručnjaka potaknuti na sumnju u prisutnost MP.

U svrhu praćenja količine MP i procjene ostatne sinteze neuključenih imunoglobulina, laboratorijska dijagnostika MG obuhvaća i kvantitativno određivanje koncentracije ukupnih

IgG, IgA i IgM. Tijekom budućnosti, određivanje ukupnih imunoglobulina će vjerojatno biti zamjenjeno testovima čija protutijela prepoznaju odgovarajući izotip teškog/lakog lanca i time omogućuju kvantitativno određivanje IgG  $\kappa$ , IgG  $\lambda$ , IgA  $\kappa$ , IgA  $\lambda$ , IgM  $\kappa$ , IgM  $\lambda$  (26).

U sva 44 uzorka (88%) u kojima je postojao jasno izražen vršak u elferogramu i u kojima je došlo do gubitka istog vrška u elferogramu prilikom imunosuptrakcije, jasno je i nedvojbeno bilo očitati rezultat imunosuptrakcije. U 6 uzoraka (12%) u kojima je postojala sumnja na prisutnost biklonalne gamapatije ili zadržane poliklonske sinteze neuključenih imunoglobulina, nije bilo moguće sa sigurnošću očitati rezultat imunosuptrakcije.

Nesigurnost u očitavanju navedenih elferograma može se djelomično objasniti nedovoljnim iskustvom u korištenju ove metode.

U uzorcima 13, 21, 28 i 41 zadržana je ostatna poliklonska sinteza neuključenih imunoglobulina što je otežalo procijenu radi li se o prisutnosti MP. Naime, kod imunofiksacije na agaroznom gelu ostaje fiksiran samo onaj protein na koji smo primijenili antiserum. Svi ostali proteini koji nisu sudjelovali u reakciji imunoprecipitacije ispiru se s gela. Dok kod imunosuptrakcije, jedina uklonjena frakcija nakon imunoreakcije s antiserumom je ona za koju je antiserum specifičan. Sve ostale frakcije ostaju u uzorku i vidljive su na elferogramu. Henskens i sur. su opisali nemogućnost tipiziranja MP imunosuptrakcijom, IgG razreda prisutnog u niskim koncentracijama i uklopljenog u poliklonsku pozadinu (27).

Iako proizvođač navodi da je granica osjetljivosti za detekciju MP kod imunosuptrakcije ista kao i kod imunofiksacije, 0,2-0,25 g/L, u uzorcima s MP prisutnim u niskoj koncentraciji i uklopljenim u poliklonsku pozadinu imunoglobulina, nije bilo moguće sa sigurnošću tumačiti rezultate imunosuptrakcije bez paralelnog izvođenja imunofiksacije.

Mnogi su autori (18,19,21) pokazali da je imunofiksacija osjetljivošću u detekciji MP nadmoćnija metodi imunosuptrakcije, posebno u slučaju zadržane poliklonske sinteze imunoglobulina.

McCudden i sur. (19) su pokazali da je za detekciju i tipiziranje MP optimalna kombinacija metoda, kapilarne zonske elektroforeze (CZE) u probiru te imunofiksacije za dokazivanje MP. Naime, ovom kombinacijom metoda visoka rezolucijska moć kapilarne zonske elektroforeze udružena je s velikom osjetljivošću imunofiksacije (25).

Primjenjivošću CZE i imunosuptrakcije, za definiranje MP, imunosuptrakcijom se dodatno ne povećava osjetljivost potvrdne metode.

Glavna prednost u korištenju imunosuptrakcije je automatizacija i brzina izvođenja (tablica 5-1.), što u velikim kliničkim laboratorijima nije zanemariva karakteristika. MP koncentracije veće od 10 g/L relativno se lako tipiziraju imunosuptrakcijom, međutim, kada je koncentracija MP manja 5 g/L teže je interpretirati rezultate imunosuptrakcije. Stoga se preporuča složenije elferograme, hipogamaglobulinemiju, biklonalne gamapatije, moguću prisutnost monoklonskih slobodnih lanaca tipizirati/potvrditi metodom imunofiksacije.

Tablica 5-1. Usporedni prikaz karakteristika metoda za imunotipizaciju MP

	Imunotipizacija	
	Imunofiksacija	Imunosuptrakcija
Elektroforeza	Gel elektroforeza	Kapilarna elektroforeza
Nosač elektroforeze	Agaroza	Otopina
Mogućnost detekcije M-proteina	IgA, IgG, IgM, IgD, IgE	IgA, IgG, IgM
Automatizacija	Poluautomatizirana	Potpuno automatizirana
Trajanje	1h i 30 min	10 min
Tehnička izvedba	Potrebna vještina	-
Interpretacija rezultata	Potrebno iskustvo	Potrebno iskustvo

U skladu s dosadašnjim objavljenim rezultatima, a i s rezultatima ovog rada, su zaključci IMWG objavljeni 2011. godine u kojima se navodi da je imunosuptrakcija dobra alternativna metoda za detektiranje i tipiziranje MP, ali niže osjetljivosti, te da imunofiksacija ostaje metoda „zlatnog standarda“ u laboratorijskoj dijagnostici MG (2).



## 6. Zaključci

1. Imunosuptrakcija je, u usporedbi s imunofiksacijom, brza i potpuno automatizirana metoda koju može izvoditi tehničko osoblje educirano i osposobljeno za izvođenje kapilarne zonske elektroforeze.
2. Glavni nedostaci imunosuptrakcije su upotreba samo pet najčešćih antiseruma te prema rezultatima ovog rada, nešto manja osjetljivost u detekciji MP.
3. Teža detekcija MP prisutnog u niskim koncentracijama postupkom imunosuptrakcije, posljedica je prisutnosti, nakon imunoreakcije, svih serumskih proteina u otopini osim MP. Zbog navedenog, za interpretaciju rezultata neophodno je educirano stručno osoblje te iskustvo u očitavanju elferograma.
4. Iako je imunosuptrakcija prikladna za kliničke laboratorije s velikim brojem uzoraka, imunofiksacija će zahvaljujući svojoj osjetljivosti za sada ostati „zlatnim standardom“ za definiranje razreda i tipa monoklonskog proteina.

## 7. Literatura

1. Matišić D. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija. U Sertić J i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi, Medicinska naklada, 2015:475-85.
2. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Khan AC i sur. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood 2011;117(18):4701-5.
3. McShane CM, Murray LJ, Landgren O, O'Rourke MA, Korde N, Kunzmann AT, Ismail MR, Anderson LA. Prior autoimmune disease and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2014;23(2):332-42.
4. Osserman EF, Takatsuki K. Considerations regarding the pathogenesis of the plasmacytic dyscrasias. Scand J Haematol 1965;4:28-49.
5. Kumar A, Galeb S, Djulbegovic B. Treatment of patients with multiple myeloma: an overview of systematic reviews. Acta Haematol 2011;125:8-22.
6. Hematologic cancer as a chronic disease. Shifting the methodology and impacting cancer care management. Dostupno na: [http://www.managedcaremag.com/sites/default/files/supplements/0807\\_hematologic/MC\\_0807\\_hematologic.pdf](http://www.managedcaremag.com/sites/default/files/supplements/0807_hematologic/MC_0807_hematologic.pdf)  
Pristupljeno 28. 10. 2015.
7. Nemet D. Suvremena dijagnostika i liječenje multiplog mijeloma. U: Matišić D, ur. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija - 2014. HKMB, Medicinska naklada, 2014:1-7.
8. Vogrinc Ž, Trbojević-Čepe M. Elektroforetske tehnike visoke djelotvornosti. U: Matišić D, ur. Primjena automatiziranih elektroforetskih metoda visoke djelotvornosti u kliničkom laboratoriju. HKMB, Medicinska naklada, 2011:1-14.

9. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Medicinska naklada; 1997, str. 151-60.
10. Le Carrer D. Serum protein electrophoresis & immunofixation: illustrated interpretations. Opag; 2005, str. 11-15, 31-52.
11. Keren DF. Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. CRC Press; 2003, str. 42-56
12. Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. Farmaceutski glasnik 2010;4:195-207.
13. Sebia Capillarys Protein(e) 6, ref. 2003, upute za korištenje ver. 2014/11. Sebia; 2014, str. 64-70.
14. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for Clinical and Laboratory Evaluation of Patients With Monoclonal Gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:106-7.
15. Šegulja D. Definiranje razreda i tipa monoklonskog imunoglobulina metodom imunosuptrakcije. U: Matišić D, ur. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamopatija - 2014. HKMB, Medicinska naklada, 2014:53-8.
16. Sebia Hydragel 2/4IF, ref. 4302, upute za korištenje, ver. 2013/10. Sebia; 2013, str. 97-106.
17. Sebia Capillarys Immunotyping, ref. 2100, upute za korištenje, ver. 2013/10. Sebia; 2013, str. 129-136, 335-341.
18. Litwin CM, Anderson SK, Philipps G, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR. Comparison of capillary zone and immunosubtraction with agarose gel and immunofixation electrophoresis for detecting and identifying monoclonal gammopathies. Am J of Clin Pathol 1999;112:411-7.

19. McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, Chapman JF, Hammett-Stabler CA, Willis MS, Grenache DG. Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* 2008;129:451-8.
20. Attaelmannan M, Levinson S. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2000;46(8):1230-8.
21. Yang Z, Harrison K, Park YA, Chaffin CH, Thigpen B, Easley PL i sur. Performance of the Sebia CAPILLARYS 2 for detection and immunotyping of serum monoclonal paraproteins. *Am J Clin Pathol* 2007;128:293-9.
22. Elecsys assays Method Manual, Roche Diagnostics, ver 2011/01.
23. D. Matišić. Laboratorijska dijagnostika monoklonskih gamapatija. U: A. Stavljenić Rukavina, M. Mesarić, ur. Biokemijske metode u biomedicinskim istraživanjima, Medicinska naklada, 2013:45-53
24. Wadhera RK, Rajkumar S. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review. *Mayo Clin Proc* 2010;85(10):933-42.
25. Henskens YMC, van Dieijen-Visser MP. Capillary zone electrophoresis as a tool to detect proteins in body fluids: reproducibility, comparison with conventional methods and review of the literature. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000;25:219-29.
26. Bradwell AR. Serum Free Light Chain Analysis, The Binding Site Group, Birmingham; 2010, str. 301-10
27. Henskens et al. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1998;44(6):1184-1190

## 8. Popis skraćenica

CZE - eng. *capillary zone electrophoresis*, kapilarna zonska elektroforeza

IFE - eng. *immunofixation electrophoresis*

IMWG - eng. *International Myeloma Working Group*

IQR - interkvartilni raspon

ISE - eng. *immunosubtraction electrophoresis*

ISS - eng. *International Staging System*

M - medijan

MG - monoklonska gamapatija

MGNZ - monoklonska gamapatija neutvrđenog značenja

MM - multipli mijelom

MP - monoklonski protein, eng. *monoclonal protein*